Kingdom of Thailand

☞ EDICT OF GOVERNMENT ☜

In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.

TIS 531-2546 (2003) (Thai): Plastics containers for sterile pharmaceutical products

BLANK PAGE

BRUTUM FULMEN

IGNORANTIA JURIS NON EXCUSAT

PROTECTED BY COPYRIGHT

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ภาชนะพลาสติก
สำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมเฉพาะ ภาชนะพลาสติกที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อที่เป็นของเหลวสำหรับฉีดเข้าสู่ร่างกาย โดยไม่รวมถึงอุปกรณ์ประกอบอื่น ๆ ซึ่งต่อไปในมาตรฐานนี้จะเรียกว่า "ภาชนะพลาสติก"

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 ผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ (sterile pharmaceutical products) หมายถึง ของเหลวที่ผ่านกรรมวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อโรคแล้ว ที่ใช้นำเข้าสู่ร่างกายเพื่อการวินิจฉัย บำบัด บรรเทา รักษา หรือป้องกันโรคหรือความเจ็บป่วยของมนุษย์และสัตว์หรือเพื่อให้เกิดผลแก่สุขภาพ โครงสร้าง หรือการกระทำหน้าที่ใด ๆ ของร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์

2.2 พลาสติกชั้น (laminar plastic) หมายถึง พลาสติกที่ประกอบด้วยแผ่นพลาสติกตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไปอัดประกบกันและส่วนประกอบแต่ละชนิดนั้นต้องไม่ละลายซึ่งกันและกัน

3. ชนิด

3.1 ภาชนะพลาสติก แบ่งตามวัสดุที่ใช้ทำเป็น 4 ชนิด คือ
- 3.1.1 พอลิเอทิลีน
- 3.1.2 พอลิโพรพิลีน
- 3.1.3 พอลิไวนิลคลอไรด์
- 3.1.4 พลาสติกชั้น

4. วัสดุ

4.1 พอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน พอลิไวนิลคลอไรด์และพลาสติกชั้นที่ใช้ทำภาชนะพลาสติก ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์เภสัชที่บรรจุ ซึ่งอาจทำให้สมบัติและคุณภาพของผลิตภัณฑ์เภสัชที่บรรจุอยู่นั้นเปลี่ยนแปลงไป และไม่มีสารที่สกัดได้ใด ๆ ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้

4.2 ในกรณีของพอลิไวนิลคลอไรด์ ต้องประกอบด้วยพอลิไวนิลคลอไรด์เรซินไม่น้อยกว่าร้อยละ 55 โดยน้ำหนัก และมีสมบัติตาม Ph.Eur.1997 หน้า 153 ถึงหน้า 155

5. คุณลักษณะที่ต้องการ

5.1 ลักษณะทั่วไป

5.1.1 ต้องไม่มีสี โปร่งแสงและมองเห็นผลิตภัณฑ์เภสัชที่บรรจุอยู่ภายในได้ชัด

5.1.2 พื้นผิวภายในและภายนอกของภาชนะพลาสติกต้องสะอาด เรียบ ยกเว้นตะเข็บที่เกิดจากแบบ (mould) และไม่มีตำหนิซึ่งอาจเป็นผลเสียต่อการใช้งาน

การทดสอบให้ทำโดยตรวจพินิจ

5.2 คุณลักษณะทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ

ต้องเป็นไปตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ

(ข้อ 5.2)

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด			วิธีทดสอบตาม
		พอลิเอทิลีน และพอลิโพรพิลีน	พอลิไวนิลคลอไรด์	พลาสติกชั้น	
1	ความจุเต็มภาชนะ มากกว่าความจุระบุ ร้อยละโดยปริมาตร ไม่น้อยกว่า	5	5	5	มอก.495
2	ความสม่ำเสมอของความหนา ผลต่างของค่าสูงสุดกับค่าต่ำสุด มิลลิเมตร ไม่เกิน	-	0.05	-	ข้อ 8.1
3	รูรั่ว	ต้องไม่มีรูรั่ว	ต้องไม่มีรูรั่ว	ต้องไม่มีรูรั่ว	ข้อ 8.2
4	ความทนทานต่อการตกกระแทก	ต้องไม่รั่วหรือแตก	-	ต้องไม่รั่ว หรือแตก	ข้อ 8.3
5	ความทนความดัน	-	ต้องไม่มีการรั่วซึม	-	ข้อ 8.4
6	ความหยุ่นตัว	-	สารละลายต้องไหลออกได้หมด โดยต้องไม่มีอากาศเข้าไปแทนที่ขณะไหล	-	ข้อ 8.5
7	การซึมผ่านของไอน้ำ น้ำหนักของน้ำที่หายไป ร้อยละ ไม่เกิน	0.20	0.20	0.20	ข้อ 8.6
8	ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา ร้อยละ ไม่เกิน	0.10	0.10	0.10	ข้อ 8.7

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ (ต่อ)

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด			วิธีทดสอบตาม
		พอลิเอทิลีน และพอลิโพรพิลีน	พอลิไวนิลคลอไรด์	พลาสติกชั้น	
9	ปริมาณอนุภาคปนเปื้อน อนุภาคต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ไม่เกิน				ข้อ 8.8
	- ขนาดระหว่าง 5 ไมโครเมตร ถึง 10 ไมโครเมตร	100	100	100	
	- ขนาดระหว่าง 10 ไมโครเมตร ถึง 25 ไมโครเมตร	10	10	10	
	- ขนาดใหญ่กว่า 25 ไมโครเมตร	1	1	1	
10	ความโปร่งแสง	ต้องยอมให้แสงผ่านได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 55			ข้อ 8.9
11	คุณลักษณะด้านความปลอดภัย สารละลายที่สกัดได้				ข้อ 8.10
	- ลักษณะสารละลาย	ต้องใส ไม่มีสี	ต้องใส ไม่มีสี	ต้องใส ไม่มีสี	
	- ฟองที่เกิดขึ้น	ฟองที่เกิดขึ้นต้องหายไปภายใน 3 นาที	ฟองที่เกิดขึ้นต้องหายไปภายใน 3 นาที	ฟองที่เกิดขึ้นต้องหายไปภายใน 3 นาที	
	- ความเป็นกรด-ด่าง ผลต่างเมื่อเทียบกับแบลงก์ ไม่เกิน	1.5	1.5	1.5	
	- ปริมาณโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนตที่ใช้ทำปฏิกิริยา ไมโครกรัมต่อสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไม่เกิน	15.8	23.7	15.8	
	- ปริมาณกากที่ไม่ระเหย ไมโครกรัมต่อสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไม่เกิน	50	50	50	
	- ปริมาณสังกะสี ไมโครกรัมต่อสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไม่เกิน	-	0.50	-	

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพ (ต่อ)

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด			วิธีทดสอบตาม
		พอลิเอทิลีน และพอลิโพรพิลีน	พอลิไวนิลคลอไรด์	พลาสติกชั้น	
	- ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด				
	- ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ถึง 240 นาโนเมตร ไม่เกิน	0.08	0.08	0.08	
	- ที่ความยาวคลื่น 241 นาโนเมตร ถึง 350 นาโนเมตร ไม่เกิน	0.05	0.05	0.05	
12	ปริมาณแคลเซียม ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	–	0.07	–	ข้อ 8.11
13	ปริมาณโลหะหนัก ไมโครกรัมต่อกรัม ไม่เกิน				ข้อ 8.12
	- ตะกั่ว	50	50	50	
	- แคดเมียม	50	50	50	
	- ดีบุก	50	50	50	
	- แบเรียม	50	50	50	
14	ปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	–	1	–	มอก.656
15	คุณลักษณะทางชีวภาพ	- ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง - ต้องไม่มีสารไพโรเจน หรือถือว่าไม่มีสารไพโรเจนเมื่อระดับเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) ไม่เกิน 20.0 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อตัวอย่าง - ต้องไม่มีการซึมผ่านของจุลินทรีย์ - ต้องไม่มีการทำลายเม็ดเลือด			ข้อ 8.13

6. เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ภาชนะพลาสติกที่ทำจากพอลิเอทิลีน หรือ พอลิโพรพิลีน หรือทั้งสองอย่าง ที่ภาชนะพลาสติกทุกใบอย่างน้อย ต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน และถาวร

(1) ชนิด

(2) ความจุ เป็นลูกบาศก์เซนติเมตรหรือลูกบาศก์เดซิเมตร พร้อมทั้งขีดบอกปริมาตร

(3) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

6.2 ภาชนะพลาสติกที่ทำจากพอลิไวนิลคลอไรด์ หรือ พลาสติกชั้น หรือทั้งสองอย่าง ที่ภาชนะพลาสติกทุกใบอย่างน้อย ต้องมีเลข อักษร หรือ เครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน และถาวร

(1) ชนิด

(2) ความจุ เป็นลูกบาศก์เซนติเมตรหรือลูกบาศก์เดซิเมตร

(3) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

6.3 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

7. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

7.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินให้เป็นไปตามภาคผนวก ก.

8. การทดสอบ

8.1 ความสม่ำเสมอของความหนา

8.1.1 เครื่องมือ

เครื่องวัดความหนาที่วัดได้ละเอียดถึง 0.001 มิลลิเมตร

8.1.2 วิธีวัด

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่าง แล้ววัดความหนาของภาชนะพลาสติกที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน 5 ตำแหน่ง ยกเว้นส่วนที่เป็นตะเข็บหรือรอยนูน แต่ละตำแหน่งให้ห่างกันพอสมควร แล้วรายงานผลต่างระหว่างความหนาสูงสุดกับความหนาต่ำสุดที่วัดได้

8.2 รูรั่ว

8.2.1 เครื่องมือ

เครื่องอัดอากาศ ที่มีมาตรความดันวัดได้ตั้งแต่ 0 กิโลพาสคัล ถึง 5 กิโลพาสคัล

8.2.2 วิธีทดสอบ

8.2.2.1 อัดอากาศเข้าไปในภาชนะพลาสติกตัวอย่างด้วยเครื่องอัดอากาศ จนความดันภายในภาชนะพลาสติกตัวอย่างมีค่า (1.5 ± 0.15) กิโลพาสคัล

8.2.2.2 จุ่มภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่อัดอากาศแล้วลงในน้ำ ให้ส่วนบนสุดของภาชนะพลาสติกตัวอย่างอยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ (20 ± 2) เซนติเมตร เป็นเวลา (1.5 ± 0.5) นาที สังเกตฟองอากาศหากมีฟองอากาศปุดขึ้นมาแสดงว่าภาชนะพลาสติกตัวอย่างมีรูรั่ว

8.3 ความทนทานต่อการตกกระแทก

ใส่น้ำที่มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องลงไปในภาชนะพลาสติกตัวอย่างเท่ากับความจุที่ระบุไว้ ปิดให้สนิท แล้วปล่อยภาชนะพลาสติกตัวอย่างจากระดับความสูง 150 เซนติเมตร ให้ตกกระแทกพื้นคอนกรีตผิวเรียบในลักษณะที่เอาด้านก้นลง 2 ครั้ง ด้านข้างลง 2 ครั้ง และด้านหัวลง 2 ครั้ง รวม 6 ครั้ง แล้วตรวจพินิจ

8.4 ความทนความดัน

8.4.1 สารละลาย

8.4.1.1 สารละลายฟลูออเรสซีนโซเดียมในน้ำ 1 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

8.4.2 วิธีทดสอบ

ใส่สารละลายฟลูออเรสซีนโซเดียมลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างจนเต็ม ปิดด้วยจุกที่ต่อกับเครื่องอัดความดัน แล้วหุ้มให้ทั่วและสนิทด้วยกระดาษนุ่มสีขาว อัดสารละลายข้างต้นด้วยความดัน 7 นิวตันต่อตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจพินิจ

หมายเหตุ *ฟลูออเรสซีนโซเดียมเป็นผงสีส้ม ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายได้ง่ายในน้ำและในเอทานอล สารละลายที่ได้ จะเรืองแสงสีเขียว*

8.5 ความหยุ่นตัว

แทงเข็มเจาะ (spike needle) เข้าทางจุกยางของภาชนะพลาสติกตัวอย่างในข้อ 8.4 แล้วสังเกตการไหลของสารละลาย

หมายเหตุ *เข็มเจาะ หมายถึง เข็มเจาะภาชนะบรรจุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 2.5 มิลลิเมตร และยาว 25 มิลลิเมตร ถึง 30 มิลลิเมตรของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดใช้ครั้งเดียว*

8.6 การซึมผ่านของไอน้ำ

8.6.1 เครื่องมือ

8.6.1.1 เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

8.6.1.2 ตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (25 ± 2) องศาเซลเซียส และควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ได้ที่ร้อยละ (65 ± 5)

8.6.2 วิธีทดสอบ

8.6.2.1 ชั่งภาชนะพลาสติกตัวอย่างพร้อมฝาปิด (ถ้ามี) ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน (W_1)

8.6.2.2 บรรจุน้ำกลั่นลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างให้ได้ปริมาณเท่ากับความจุที่ระบุไว้ ปิดให้สนิท แล้วชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน (W_2)

8.6.2.3 นำไปเก็บไว้ในที่ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ (25 ± 2) องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ (65 ± 5) เป็นเวลา (336 ± 1) ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด ให้นำภาชนะพลาสติกตัวอย่างไปชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอนอีกครั้งหนึ่ง (W_3)

$$\text{น้ำที่หายไป ร้อยละ} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักภาชนะพลาสติกตัวอย่างพร้อมฝาปิด (ถ้ามี) เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักภาชนะพลาสติกตัวอย่างและน้ำกลั่นก่อนการทดสอบ เป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนักภาชนะพลาสติกตัวอย่างและน้ำกลั่นหลังการทดสอบ เป็นกรัม

8.7 ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา

8.7.1 เครื่องมือ

8.7.1.1 เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

8.7.1.2 เตาเผาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (500 ± 50) องศาเซลเซียส

8.7.1.3 ครูซิเบิล แพลทินัม ควอตซ์ หรือกระเบื้องเคลือบ ที่เผาที่อุณหภูมิ (500 ± 50) องศาเซลเซียส และชั่งที่อุณหภูมิห้องจนได้น้ำหนักคงที่แล้ว (b)

8.7.1.4 เดซิกเคเตอร์

8.7.2 สารเคมี

กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ความหนาแน่น 1.84 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

8.7.3 วิธีทดสอบ

8.7.3.1 ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน แต่ละใบให้มีพื้นที่เท่า ๆ กัน นำมารวมกันตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน แบ่งมาประมาณ 5 กรัม ชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน (W) แล้วใส่ลงในครูซิเบิล

8.7.3.2 หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 หยด ถึง 3 หยดลงในครูซิเบิล เผาด้วยไฟอ่อน ๆ จนพลาสติกกลายเป็นถ่าน ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปอีกเล็กน้อย เผาต่อด้วยไฟอ่อน ๆ จนหมดควัน แล้วเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ (500 ± 50) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่ง แล้วเผาซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ (a)

8.7.4 วิธีคำนวณ

$$\text{กากที่เหลือจากการเผา ร้อยละ} = \frac{a - b}{W} \times 100$$

เมื่อ a คือ น้ำหนักครูซิเบิลและกากที่เหลือจากการเผา เป็นกรัม

b คือ น้ำหนักครูซิเบิล เป็นกรัม

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

8.8 ปริมาณอนุภาคปนเปื้อน

8.8.1 ภาวะทดสอบ

ทำในที่ที่ปราศจากฝุ่น อุปกรณ์และเครื่องมือต้องสะอาด

8.8.2 เครื่องมือ

เครื่องนับจำนวนอนุภาคอัตโนมัติที่ทำงานด้วยหลักการกั้นแสง (light-shielded automatic fine particle counter) ที่ได้สอบเทียบกับอนุภาคมาตรฐานแล้วที่สามารถนับอนุภาคที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1.5 ไมโครเมตร

8.8.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

8.8.3.1 ล้างภาชนะพลาสติกตัวอย่างทั้งภายนอกและภายในให้ทั่วด้วยน้ำกลั่น จากนั้นบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จนถึงขีดบรรจุ ปิดจุกให้แน่น โดยให้มีปริมาณอากาศภายในภาชนะพลาสติกตัวอย่างประมาณ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อขนาดบรรจุ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ตั้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำภาชนะพลาสติกตัวอย่างออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ถ้าภาชนะพลาสติกเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส ให้เตรียมสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิสูงสุดที่ภาชนะพลาสติกจะไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเลือกใช้ภาวะใดภาวะหนึ่งต่อไปนี้ คือที่อุณหภูมิ (70 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (24 ± 2) ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ (50 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (72 ± 2) ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ (37 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (72 ± 2) ชั่วโมง

8.8.3.2 ทำความสะอาดภายนอกภาชนะพลาสติกตัวอย่าง คว่ำส่วนหัวภาชนะพลาสติกตัวอย่างลงแล้วหงายขึ้น 5 ครั้ง ถึง 6 ครั้ง เพื่อให้สารละลายผสมกันดี แล้วรีบแทงเข็มเจาะที่สะอาดเข้าไปในจุกยาง ดูดสารละลาย 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่แกว่งภาชนะพลาสติกไปมาเบา ๆ เก็บไว้ในภาชนะสะอาดที่ใช้หาจำนวนอนุภาค

8.8.4 วิธีทดสอบ

8.8.4.1 สอบเทียบเครื่องนับจำนวนอนุภาค โดยใช้สารละลายที่มีอนุภาคมาตรฐานในน้ำกลั่นหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร

หมายเหตุ *อนุภาคมาตรฐานคือ อนุภาคพอลิสไตรีนทรงกลม (spherical polystyrene particles) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร 10 ไมโครเมตร และ 25 ไมโครเมตร*

8.8.4.2 นับจำนวนอนุภาคขนาดต่าง ๆ ตามที่กำหนดในสารละลายตัวอย่าง 5 ครั้ง ขณะนับจำนวนอนุภาคต้องกวนสารละลายไปด้วย แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยตัดค่าที่นับได้ครั้งที่ 1 ออก

หมายเหตุ *น้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ในการทดสอบต้องมีจำนวนอนุภาคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 5 ไมโครเมตร ถึง 10 ไมโครเมตร ไม่เกิน 0.5 อนุภาคต่อลูกบาศก์เซนติเมตร*

8.9 ความโปร่งแสง

8.9.1 เครื่องมือ

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

8.9.2 วิธีทดสอบ

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างจำนวน 5 ชิ้น ตรงบริเวณที่มีเนื้อสม่ำเสมอ โค้งน้อย และหนาเท่ากัน ให้ได้ขนาด 0.9 เซนติเมตร x 4 เซนติเมตร นำชิ้นภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละชิ้นใส่ลงในน้ำกลั่นที่บรรจุอยู่ในเซลล์ แล้วนำไปวัดค่าการส่งผ่านของแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงก์

8.10 คุณลักษณะด้านความปลอดภัย

8.10.1 การเตรียมตัวอย่างรวม

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างทุกใบตรงบริเวณที่มีเนื้อสม่ำเสมอ และโค้งน้อยที่สุด ให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่า ๆ กัน นำมารวมกันให้พื้นที่ผิวภายในและภายนอกรวมกันได้ 1 200 ตารางเซนติเมตร สำหรับพลาสติกที่มีความหนาไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร และ 600 ตารางเซนติเมตร สำหรับพลาสติกที่มีความหนาเกิน 0.5 มิลลิเมตร

8.10.2 การเตรียมสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์

8.10.2.1 เครื่องมือ

(1) หม้อนึ่งอัด ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (121 ± 2) องศาเซลเซียส

(2) ตู้อบ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

(3) ภาชนะแก้วบอโรซิลิเกตขนาด 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร พร้อมฝาที่ปิดได้สนิท

8.10.2.2 วิธีเตรียม

(1) สารละลายที่สกัดได้

ตัดชิ้นพลาสติกตามข้อ 8.10.1 ออกเป็นชิ้นย่อย ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร x 5 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่น ปล่อยไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ แล้วใส่ลงในภาชนะแก้วบอโรซิลิเกต เติมน้ำกลั่นลงไป 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดฝาให้สนิท นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง

สำหรับภาชนะพลาสติกที่ทำจากพลาสติกชั้น ให้เติมน้ำกลั่นลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่าง บันทึกปริมาตรน้ำกลั่นและพื้นที่ภายในภาชนะพลาสติกตัวอย่าง ปิดให้สนิท นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าภาชนะพลาสติกเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส ให้เตรียมสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิสูงสุดที่ภาชนะพลาสติกไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยเลือกใช้ภาวะใดภาวะหนึ่งต่อไปนี้คือ ที่อุณหภูมิ (70 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (24 ± 2) ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ (50 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (72 ± 2) ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (72 ± 2) ชั่วโมง

(2) สารละลายแบลงก์

ให้เตรียมโดยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลายที่สกัดได้ แต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

8.10.3 วิธีทดสอบ

8.10.3.1 ลักษณะสารละลาย

ตรวจดูสารละลายที่สกัดได้ ถ้าใส ไม่มีสี จึงจะวิเคราะห์รายการอื่น ๆ ต่อไป

8.10.3.2 การเกิดฟอง

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 15 มิลลิเมตร และยาว 200 มิลลิเมตร ปิดฝาให้สนิท แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 3 นาที จับเวลาพร้อมกับสังเกตฟองที่เกิดขึ้น

8.10.3.3 ความเป็นกรด-ด่าง

(1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์อย่างละ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร อย่างละใบ

(2) เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ลงในบีกเกอร์ทั้ง 2 ใบ ใบละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายในบีกเกอร์แต่ละใบด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

8.10.3.4 ปริมาณโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนตที่ใช้ทำปฏิกิริยา

(1) เครื่องมือ

ขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร พร้อมจุกแก้ว จำนวน 2 ใบ

(2) สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(2.1) สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 31.6 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

(2.2) สารละลายกรดซัลฟิวริก ร้อยละ 5.7 โดยปริมาตร

(2.3) สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 2.6 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 20 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นที่เพิ่งต้มเดือดและปล่อยไว้ให้เย็นจำนวนเล็กน้อยในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1 000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นที่เพิ่งต้มเดือดและปล่อยไว้ให้เย็นแล้วจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

(2.4) อินดิเคเตอร์แป้ง (starch indicator) ที่เตรียมขึ้นใหม่ ละลายแป้ง (soluble starch) 1 กรัม ด้วยน้ำเย็น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเทลงในน้ำเดือด 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร อย่างช้า ๆ และคนอย่างสม่ำเสมอ ต้มสารละลายที่ได้ให้เดือดจนกระทั่งมีลักษณะโปร่งแสง

(2.5) โพแทสเซียมไอโอไดด์

(3) วิธีวิเคราะห์

(3.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ในขวดแก้วรูปกรวยใบที่หนึ่ง เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 3 นาที ปล่อยไว้ให้เย็น เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.10 กรัม ปิดจุกให้แน่น เขย่า ปล่อยไว้เป็นเวลา 10 นาที เติมอินดิเคเตอร์แป้ง 5 หยด แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

(3.2) ทดลองซ้ำตามข้อ (3.1) โดยใช้สารละลายแบลงก์ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ในขวดแก้วรูปกรวยใบที่สอง

8.10.3.5 ปริมาณกากที่ไม่ระเหย

(1) เครื่องมือ

(1.1) เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

(1.2) ตู้อบแบบอากาศหมุนเวียนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (105 ± 2) องศาเซลเซียส

(1.3) ครูซิเบิล ควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ ที่เผาจนน้ำหนักคงที่แล้ว 2 ใบ

(1.4) เครื่องอังไอน้ำ

(1.5) เดซิกเคเตอร์

(2) วิธีวิเคราะห์

(2.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในครูซิเบิลใบที่หนึ่ง และสารละลายแบลงก์ปริมาตรเท่ากัน ใส่ลงในครูซิเบิลใบที่สอง นำไประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำ

(2.2) อบครูซิเบิลทั้ง 2 ใบ ในตู้อบที่อุณหภูมิ (105 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่งแล้วอบซ้ำเป็นเวลาครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ ผลต่างของน้ำหนักกากในครูซิเบิลใบที่หนึ่งและใบที่สองต้องไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม จึงจะถือว่าสารละลายที่สกัดได้ มีกากที่ไม่ระเหยไม่เกิน 50 ไมโครกรัมต่อสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8.10.3.6 ปริมาณสังกะสี

(1) เครื่องมือ

อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ใช้สังกะสีฮอลโลว์แคโทดแลมป์

(2) สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(2.1) สารละลายกรดไนทริก 50 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

(2.2) สารละลายมาตรฐานสังกะสีเผื่อใช้ (standard zinc stock solution)

ละลายสังกะสีบริสุทธิ์ 1.000 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1 000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นความหนาแน่น 1.18 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้เย็นลง เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร

(2.3) สารละลายมาตรฐานสังกะสี

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานสังกะสีเผื่อใช้มา 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1 000 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร ให้เตรียมสารละลายนี้ใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง สารละลายนี้ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรมีปริมาณสังกะสี 0.01 มิลลิกรัม

(3) วิธีวิเคราะห์

(3.1) เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้มา 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยสารละลายกรดไนทริกจนสารละลายมีปริมาตร 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร

(3.2) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานสังกะสีมา 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยสารละลายกรดไนทริกจนสารละลายมีปริมาตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร

(3.3) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายจากข้อ (3.2) มา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายกรดไนทริกจนสารละลายมีปริมาตร 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานสอบเทียบ

(3.4) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานสอบเทียบ โดยใช้อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 213.9 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างต้องไม่มากกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานสอบเทียบ จึงจะถือว่าสารละลายที่สกัดได้มีสังกะสีไม่เกิน 0.50 ไมโครกรัมต่อสารละลาย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8.10.3.7 การดูดกลืนแสง

(1) เครื่องมือ

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นในช่วง 220 นาโนเมตร ถึง 350 นาโนเมตร

(2) วิธีวิเคราะห์

นำสารละลายที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ถึง 240 นาโนเมตร และในช่วงความยาวคลื่น 241 นาโนเมตร ถึง 350 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายแบลงก์

8.11 ปริมาณแคลเซียม

8.11.1 เครื่องมือ

อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ใช้แคลเซียมฮอลโลว์แคโทดแลมป์และใช้เปลวไฟจากอากาศ–อะเซทิลีน

8.11.2 สารละลายและวิธีเตรียม

8.11.2.1 สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ละลายแคลเซียมคาร์บอเนต 1.00 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร 23 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายที่ได้มีปริมาตร 100.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร เจือจางสารละลายนี้ 1 ส่วนด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 ส่วนทันทีก่อนใช้

8.11.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งมา 2.0 กรัม นำไปเผาในครูซิเบิลซิลิกา ละลายเถ้าที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ความหนาแน่น 1.19 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไประเหยให้แห้งบนเครื่องอังน้ำ ใช้น้ำกลั่น 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ละลายกากที่เหลือ กรองแล้วเจือจางสารละลายที่ได้จนมีปริมาตร 25.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8.11.4 วิธีวิเคราะห์

นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 422.7 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายอ้างอิง

8.12 ปริมาณโลหะหนัก

8.12.1 การเตรียมตัวอย่างรวม

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างทุกใบตรงบริเวณที่มีเนื้อสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุด ให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่า ๆ กัน นำมารวมกันให้ได้น้ำหนักประมาณ 10 กรัม ล้างด้วยน้ำกลั่น ปล่อยไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ

8.12.2 ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม และดีบุก

8.12.2.1 เครื่องมือ

อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

8.12.2.2 วิธีวิเคราะห์

ให้ปฏิบัติตาม JP 14 หัวข้อ Test methods for plastic containers

8.12.3 ปริมาณแบเรียม

8.12.3.1 เครื่องมือ

หลอดเทียบสี ขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 2 หลอด

8.12.3.2 สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(1) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ความหนาแน่น 1.42 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

(2) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

(3) สารละลายกรดซัลฟิวริก 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

(4) สารละลายมาตรฐานแบเรียม 20 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ละลายแบเรียมคลอไรด์บริสุทธิ์ 0.178 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย ในขวดแก้วปริมาตร ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากันใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่ได้ 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตร ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

8.12.3.3 วิธีวิเคราะห์

(1) ชั่งชิ้นตัวอย่าง 4.0 กรัม ใส่ในชามกระเบื้องเคลือบ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 หยด ถึง 3 หยด แล้วเผาจนเป็นเถ้า

(2) ละลายเถ้าที่ได้ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร กรองลงในหลอดเทียบสีหลอดที่หนึ่ง เติมน้ำกลั่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน

(3) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานแบเรียม 10.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในหลอดเทียบสีหลอดที่สอง แล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายกรดซัลฟิวริก 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน

(4) เปรียบเทียบความขุ่นที่เกิดขึ้นในหลอดเทียบสีทั้งสอง สารละลายในหลอดที่หนึ่งต้องไม่ขุ่นกว่าสารละลายในหลอดที่สอง จึงจะถือว่ามีแบเรียมไม่เกิน 50 ไมโครกรัมต่อกรัม

8.13 คุณลักษณะทางชีวภาพ

8.13.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (cytotoxicity testing)

ให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้วิธีทดสอบอื่นที่เทียบเท่าตามที่กำหนดใน ISO 10993-5 ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งให้ใช้วิธีทดสอบในมาตรฐานเป็นวิธีตัดสิน

8.13.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

(1) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ปราศจากเชื้อลามินาร์แอร์โฟลว์ ตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องมือนับเม็ดเลือด (haemocytometer)

(2) อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ ได้แก่ หม้อนึ่งอัด ตู้อบร้อน

(3) จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม

(4) ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเตรียมตัวอย่าง

(5) ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ (tissue culture flask) ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร

8.13.1.2 สารละลายและวิธีเตรียม

(1) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ

ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 8.0 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 1.15 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 $\pm$ 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน

(2) สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ

(3) สารละลายทริปซิน (trypsin) 0.5 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ

(4) สารละลายกลูทามีน (glutamine) 29.2 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ

(5) อาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มอีเอ็ม (Eagle's MEM)

(6) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต

เติมสารละลายกลูทามีน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เซรุ่มฟีทัลโบไวน์ (fetal bovine serum) 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มอีเอ็ม 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในขวดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ถึง 8 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

(7) สารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต (formalin-crystal violet)

ละลายคริสทัลไวโอเลต 500 มิลลิกรัม และสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ (BP) 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(8) สีย้อมทริปแพนบลู (trypan blue stain) 4.0 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

(9) วัสดุควบคุมเชิงบวก (positive material control) เป็นแผ่นพอลิไวนิลคลอไรด์ที่มีซิงก์ไดเอทิลไดไทโอคาร์บาเมต ร้อยละ 0.1

(10) วัสดุควบคุมเชิงลบ (negative material control) เป็นแผ่นพลาสติก เช่น พอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน หรือแผ่นยาง ที่ปราศจากสารเติมแต่ง

8.13.1.3 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

(1) การเตรียมสารแขวนตะกอนของเซลล์เนื้อเยื่อ

นำเซลล์เนื้อเยื่อ L–929 (ATCC cell line CCL 1, NCTC clone 929) ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เติมสารละลายทริปซิน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และอบในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ถึง 5 นาที เคาะขวดเบา ๆ จนเซลล์หลุดร่อนจากพื้นผิวขวด แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถึง 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในขวด เขย่าขวดให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียว นำสารแขวนตะกอนที่ได้นี้ไปวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยดูดสารแขวนตะกอนของเซลล์ 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาผสมกับสีย้อมทริปแพนบลู 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนตะกอนโดยใช้เครื่องมือนับเม็ดเลือด ทำการเจือจางสารแขวนตะกอนของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตให้ได้ความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

(2) นำเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม หลุมละ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ (37 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน จนเซลล์โตเป็นชั้นเดียว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์

8.13.1.4 วิธีทดสอบ

(1) การเตรียมชิ้นพลาสติกตัวอย่างและวัสดุควบคุม

(1.1) การเตรียมชิ้นพลาสติกตัวอย่าง

ตัดชิ้นพลาสติกจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างอย่างน้อย 2 ชิ้น ให้มีพื้นที่ผิวชิ้นละไม่น้อยกว่า 100 ตารางมิลลิเมตร ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว ล้างและนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด

(1.2) การเตรียมวัสดุควบคุม

เตรียมวัสดุควบคุมเชิงบวก และวัสดุควบคุมเชิงลบ ตามวิธีในข้อ 8.13.1.4(1.1)

(2) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก

(3) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต หลุมละ 0.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร

(3.1) วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ 2 หลุม ๆ ละ 1 ชิ้น

(3.2) วางวัสดุควบคุมเชิงบวก 2 หลุม ๆ ละ 1 ชิ้น

(3.3) วางวัสดุควบคุมเชิงลบ 1 หลุม ๆ ละ 1 ชิ้น

(3.4) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตเพื่อใช้เป็นแบลงก์ 1 หลุม

(4) นำจานเลี้ยงเซลล์ไปอบในตู้อบชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ให้ประเมินผลตามวิธีในข้อ 8.13.1.5

8.13.1.5 การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ สัมผัสกับชิ้นพลาสติกตัวอย่าง ชิ้นวัสดุควบคุม และแบลงก์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์และวง (zone) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผลตามตารางที่ 2 หลังจากบันทึกผลที่ 24 ชั่วโมงแล้ว และต้องการเก็บเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลานาน ให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ให้ติดบนจานเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต

ตารางที่ 2 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

(ข้อ 8.13.1.5)

ระดับ (grade)	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ (conditions of cell cultures)
0	ไม่เป็นพิษ (none toxic)	ไม่พบวงรอบ ๆ หรือภายใต้ชิ้นพลาสติกตัวอย่าง
1	เป็นพิษน้อยมาก (slightly toxic)	พบเซลล์มีรูปร่างผิดปกติภายใต้ชิ้นพลาสติกตัวอย่าง
2	เป็นพิษน้อย (mild toxic)	มีเซลล์ตายเป็นวงจำกัดอยู่ในพื้นที่ใต้ชิ้นพลาสติกตัวอย่าง
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate toxic)	มีเซลล์ตายเป็นวงแผ่ขยายออกจากชิ้นพลาสติกตัวอย่าง 0.5 เซนติเมตร-1.0 เซนติเมตร
4	เป็นพิษรุนแรง (severe toxic)	มีเซลล์ตายเป็นวงแผ่ขยายออกจากชิ้นพลาสติกตัวอย่างมากกว่า 1.0 เซนติเมตร

8.13.1.6 การแปลผล

(1) การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ ต่อเมื่อ

(1.1) แบลงก์ และวัสดุควบคุมเชิงลบ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ความเป็นพิษระดับ 0)

(1.2) วัสดุควบคุมเชิงบวก มีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 3 ขึ้นไป

(2) เกณฑ์ตัดสิน

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเมื่อชิ้นพลาสติกตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มากกว่าระดับ 2

8.13.2 สารไพโรเจน

ต้องเป็นไปตามวิธีที่ 1 หรือวิธีที่ 2

8.13.2.1 วิธีที่ 1

(1) การเตรียมสารละลายทดสอบ

ตัดชิ้นพลาสติกจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างทุกใบ ตรงบริเวณที่มีเนื้อสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุด ให้มีขนาดชิ้นละประมาณ 4 ตารางเซนติเมตร นำมารวมกันให้มีพื้นที่ผิวภายในและภายนอกรวมกันได้ 500 ตารางเซนติเมตร แล้วใส่ลงในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เทน้ำกลั่นออกให้แห้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์สำหรับฉีด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลาย ทดสอบที่ได้ในภาชนะที่สะอาด แห้งและปราศจากเชื้อ และปรับอุณหภูมิของสารละลายทดสอบให้เท่ากับ 38.5 องศาเซลเซียส ก่อนทดสอบโดยใช้เครื่องอังน้ำ

(2) สัตว์ที่ใช้ทดสอบ

กระต่ายที่มีสุขภาพดี มีน้ำหนักไม่น้อยกว่า 1.8 กิโลกรัม กระต่ายที่เคยผ่านการทดสอบสารไพโรเจนมาแล้ว สามารถนำมาใช้ทดสอบซ้ำได้อีก โดยเว้นช่วงการทดสอบให้ห่างกัน 3 วัน สำหรับกระต่ายที่มีอุณหภูมิร่างกายปกติ และเว้นช่วงการทดสอบให้ห่างกัน 14 วัน สำหรับกระต่ายที่มีอุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติภายหลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 องศาเซลเซียส และให้กระต่ายที่ใช้ทดสอบทุกตัวอดอาหารเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดสอบแต่ละครั้ง

(3) วิธีทดสอบ

(1) วัดอุณหภูมิร่างกายของกระต่าย 3 ตัว เป็นเวลา 40 นาที จนได้อุณหภูมิคงที่ในช่วง 38.0 องศาเซลเซียส ถึง 39.8 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิปกติ, T_1)

(2) ฉีดสารละลายทดสอบที่มีอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส (ข้อ 8.13.2.1(1)) เข้าทางเส้นเลือดดำที่บริเวณใบหู (marginal ear vein) ของกระต่ายทั้ง 3 ตัว ในปริมาณ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อ กิโลกรัมของน้ำหนักกระต่ายแต่ละตัว

(3) วัดอุณหภูมิร่างกายของกระต่ายทุกตัวทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากฉีด (อุณหภูมิทดสอบ, T_2) บันทึกอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นสูงสุดของกระต่ายแต่ละตัว แล้วคำนวณผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ (T_2–T_1)

(4) การประเมิน

(1) ถ้าผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ (T_2–T_1) ของกระต่ายทั้ง 3 ตัว รวมกันแล้วไม่เกิน 1.4 องศาเซลเซียส และไม่มีกระต่ายตัวใดมีผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ (T_2–T_1) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.6 องศาเซลเซียส ให้ถือว่าภาชนะพลาสติกตัวอย่างไม่มีสารไพโรเจน

(2) ถ้ามีกระต่ายตัวใดตัวหนึ่งมีผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ (T_2–T_1) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.6 องศาเซลเซียส หรือถ้ากระต่ายทั้ง 3 ตัว มีผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ (T_2–T_1) รวมกันเกิน 1.4 องศาเซลเซียส ให้ทดสอบเพิ่มโดยใช้กระต่ายอีก 5 ตัว และผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ (T_2–T_1) ของกระต่ายทั้ง 8 ตัวรวมกันต้องไม่เกิน 3.7 องศาเซลเซียส และมีกระต่ายไม่เกิน 3 ตัว ที่มีผลต่างระหว่างอุณหภูมิทดสอบกับอุณหภูมิปกติ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.6 องศาเซลเซียส จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกตัวอย่างไม่มีสารไพโรเจน

8.13.2.2 วิธีที่ 2

ให้ปฏิบัติตาม USP 26 หัวข้อ Bacterial endotoxins test โดยใช้สารละลายทดสอบ ข้อ 8.13.2.1(1)

8.13.3 การซึมผ่านของจุลินทรีย์

8.13.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ใช้เชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* ATCC 6633 (*Bacillus subtillis* ATCC 6633) และเชื้อ*ซาลโมเนลลา คอเลอเรซูอิส* ATCC 10708 (*Salmonella choleraesuis* ATCC 10708)

8.13.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

(1) ฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม

แอล-ซีสทีน	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.5	กรัม
เดกซ์โทรส	5.5	กรัม
อะการ์	0.75	กรัม
ยีสต์เอกซ์แทรกต์	5.0	กรัม
เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatic digest of casein)	15.0	กรัม
โซเดียมไทโอไกลโคเลต (หรือกรดไทโอไกลโคลิก 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.5	กรัม
สารละลายเรซาซูรินโซเดียม (resazurin sodium solution) ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรที่เตรียมขึ้นใหม่	1.0	ลูกบาศก์เซนติเมตร
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

นำแอล-ซีสทีน โซเดียมคลอไรด์ เดกซ์โทรส อะการ์ ยีสต์เอกซ์แทรกต์ และเคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน มาผสมรวมกันในโกร่งและบดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย คนให้เข้ากันแล้วเทสารละลายที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ ล้างโกร่งด้วยน้ำกลั่นจำนวนที่เหลือ เทรวมกันในบีกเกอร์ นำไปทำให้ร้อน เติมโซเดียมไทโอไกลโคเลตหรือกรดไทโอไกลโคลิกลงไป ปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่า (7.1 $\pm$ 0.2) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (ถ้าจำเป็นต้องกรอง ให้นำสารละลายที่ได้มาทำให้ร้อนแต่ไม่ให้เดือด แล้วกรองในขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่เปียกชื้น) เติมสารละลายเรซาซูรินโซเดียม ผสมให้เข้ากัน แล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 กิโลพาสคัล เป็นเวลา 15 นาที

(2) ซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม

เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน	17.0	กรัม
ซอยบีนมีลที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (papaic digest soybean meal)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดเบสิกโพแทสเซียมฟอสเฟต	2.5	กรัม

เดกซ์โทรส	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลูกบาศก์เดซิเมตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ต้มให้ละลาย แล้วปล่อยไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น (7.3 ± 0.2) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร กรอง แล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 กิโลพาสคัล เป็นเวลา 15 นาที

8.13.3.3 การเตรียมเชื้อเผื่อใช้ (stock culture)

(1) การเตรียมเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส*

ให้เพาะลงบนอะการ์ผิวเอียงของฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียมที่มีอะการ์ 20 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ถึง 8 องศาเซลเซียส

(2) การเตรียมเชื้อ*ซาลโมเนลลา คอเลอเรซูอิส*

ให้เพาะลงบนอะการ์ผิวเอียงของซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม ที่มีอะการ์ 20 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.13.3.4 การเตรียมเชื้อทดสอบ (inoculum)

(1) ถ่ายเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* จากเชื้อเผื่อใช้ (ข้อ 8.13.3.3) ลงในขวดเพาะเชื้อขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร

(2) ถ่ายเชื้อ*ซาลโมเนลลา คอเลอเรซูอิส* จากเชื้อเผื่อใช้ (ข้อ 8.13.3.3) ลงในขวดเพาะเชื้อขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร

(3) นำขวดเพาะเชื้อในข้อ (1) และข้อ (2) ไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.13.3.5 วิธีวิเคราะห์

(1) ใส่ฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม และซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม ลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 3 สดมภ์ที่ 2 ให้ได้ปริมาณเท่ากับความจุที่ระบุไว้ของภาชนะพลาสติกตัวอย่างนั้น แล้วปิดให้สนิท

(2) วางภาชนะพลาสติกตัวอย่างตามข้อ (1) ลงในภาชนะที่เหมาะสม (เช่น ขวดแก้วปากกว้างรูปทรงกระบอก อ่างแก้ว) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันกับที่มีอยู่ในภาชนะพลาสติกตัวอย่าง โดยให้พื้นที่ผิวภายนอกของภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบจมอยู่ใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่น้อยกว่าร้อยละ 60

(3) เติมเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* ที่ใช้ทดสอบ ลงในภาชนะที่บรรจุฟลูอิดไทโอไกลโครเลตมีเดียมจำนวน 1 ขวด (100 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดปากภาชนะด้วยกระจก

(4) เติมเชื้อ*ซาลโมเนลลา คอเลอเรซูอิส* ที่ใช้ทดสอบ ลงในภาชนะที่บรรจุซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม จำนวน 1 ขวด (100 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร ผสมให้ เข้ากัน แล้วปิดปากภาชนะด้วยกระจก

(5) นำภาชนะในข้อ (3) และข้อ (4) ไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(6) เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำภาชนะพลาสติกตัวอย่างทั้งหมดออกมาเขย่า ล้างด้านในโดยรอบด้วยน้ำ แล้วนำไปแช่ในสารละลายโพรพานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร เป็นเวลา 120 วินาที และล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

(7) ใช้แท่งแก้วร้อนแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร เจาะผนังภาชนะพลาสติกตัวอย่าง (ข้อ (6)) บริเวณเหนือผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายในทันทีแล้วใช้เข็มฉีดยาที่ปราศจากเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบตามปริมาณที่กำหนดในตารางที่ 3 สดมภ์ที่ 4

(8) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดูดเอาไว้จากภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบ (ข้อ (7)) ใส่ลงในขวดเพาะเชื้อซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 3 สดมภ์ที่ 5 โดยให้ปริมาตรทั้งหมดของหารเลี้ยงเชื้อในขวดเพาะเชื้อแต่ละใบเป็น 10.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำขวดเพาะเชื้อทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด สังเกตดูว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ในขวดเพาะเชื้อแต่ละใบหรือไม่

8.13.3.6 การประเมินผล

ให้ถือว่าภาชนะพลาสติกตัวอย่างไม่มีการซึมผ่านของจุลินทรีย์ต่อเมื่อขวดเพาะเชื้อทุกใบปราศจากการเจริญของจุลินทรีย์

ตารางที่ 3 การทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์

(ข้อ 8.13.3.5)

ความจุของภาชนะพลาสติกตัวอย่าง ลูกบาศก์เซนติเมตร	จำนวนภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ		ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดูดจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบ	จำนวนขวดเพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบ ใบ
	อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดละ ใบ	รวม ใบ		
ไม่เกิน 100	5	10	ร้อยละ 1 โดยปริมาตรของความจุ แต่ต้องไม่น้อยกว่า 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร	1
101 ถึง 500	3	6	ร้อยละ 1 โดยปริมาตรของความจุ	2
501 ขึ้นไป	1	2	ร้อยละ 1 โดยปริมาตรของความจุ แต่ไม่เกิน 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร	5

8.13.4 การทำลายเม็ดเลือด

8.13.4.1 เครื่องมือ

(1) ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

(2) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

(3) เครื่องหมุนเหวี่ยง

(4) หม้อนึ่งอัด

(5) ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ± 1) องศาเซลเซียส

8.13.4.2 สารเคมี สารละลาย และวิธีเตรียม

(1) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนัก ที่ปราศจากเชื้อ

(2) สารมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน (hemoglobin reference standard) 6 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

(3) สารละลายแดรบคิน (Drabkin solution)

ละลายโซเดียมไบคาร์บอนเนต 1 กรัม โพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.05 กรัม และโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8.13.4.3 การเตรียมเลือดกระต่าย

เจาะเลือดกระต่ายอย่างน้อย 3 ตัว ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น แอซิดซิเทรตเด็กซ์โทรส (acid citrate dextrose, ACD) ซิทริก ฟอสเฟตเด็กซ์โทรส (citric phosphate dextrose, CPD) แยกเก็บในภาชนะเก็บเลือดของกระต่ายแต่ละตัวที่อุณหภูมิ (4 ± 2) องศาเซลเซียส และควรนำมาทำการทดสอบภายใน 96 ชั่วโมง

8.13.4.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

(1) ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละหน่วยตรงบริเวณที่มีเนื้อสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุดให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่า ๆ กัน นำมารวมกันให้พื้นที่ผิวภายในและภายนอกรวมกันได้ 120 ตารางเซนติเมตร สำหรับภาชนะพลาสติกหนาไม่เกินหรือเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตร และ 60 ตารางเซนติเมตร สำหรับภาชนะพลาสติกที่หนาเกิน 0.5 มิลลิเมตร แล้วนำมาตัดออกเป็นชิ้นย่อยขนาดประมาณ 0.3 เซนติเมตร X 5 เซนติเมตร ใส่ลงในขวดแก้วรูปกรวย เติมน้ำกลั่นสำหรับฉีด 70 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดจุก เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วเทน้ำทิ้ง ทำซ้ำเช่นเดียวกันนี้อีกครั้งหนึ่ง แล้วปล่อยไว้ให้แห้ง

(2) สกัดชิ้นพลาสติกตัวอย่างที่ล้างด้วยน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้ว ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ปราศจากเชื้อ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร พร้อมทั้งทำแบลงก์เปรียบเทียบโดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง ผนึกหรือปิดฝาให้สนิท

(3) นำภาชนะสำหรับสกัดทั้ง 2 ใบ ใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ (70 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ (50 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำออกมาปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (แต่ต้องไม่ต่ำกว่า 22 องศาเซลเซียส) เขย่าอย่างแรงเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

แล้วเทสารละลายสกัดที่ได้และแบลงก์ในแต่ละภาชนะลงในภาชนะที่สะอาด แห้ง และปราศจากเชื้อทันที นำไปเก็บไว้ในที่ซึ่งมีอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 22 องศาเซลเซียส และต้องนำไปทดสอบต่อไปภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากที่เตรียมได้

8.13.4.5 วิธีทดสอบ

(1) การเตรียมกราฟสอบเทียบ

(1.1) เตรียมสารละลายสอบเทียบ โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 5 ใบตามลำดับ เจือจางด้วยสารละลายแดรบคินจนถึงขีดปริมาตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 0.3 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 0.12 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร 0.06 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ

(1.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสอบเทียบแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(1.3) สร้างกราฟสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน เป็นมิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร กับค่าการดูดกลืนแสง

(2) การตรวจหาระดับพลาสมาฮีโมโกลบินในเลือด

(2.1) นำเลือดกระต่ายแต่ละภาชนะบรรจุ ตามข้อ 8.13.4.3 ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยง และนำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับด้วยอัตราเร็ว 700 G ถึง 800 G นาน 15 นาที

(2.2) ดูดส่วนใสด้านบน (พลาสมา) 100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ไมโครลิตร) เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(2.3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาของเลือดกระต่ายแต่ละตัว เป็นมิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

(2.4) ถ้าเลือดกระต่ายตัวใดมีปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาเกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จะไม่นำเลือดกระต่ายตัวนั้นมาใช้ในการทดสอบต่อไป และต้องใช้เลือดกระต่ายในการทดสอบ 3 ตัว

(3) การเจือจางเลือด

(3.1) นำเลือดกระต่ายแต่ละตัวที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาแล้ว 20 ลูกบาศก์มิลลิเมตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

(3.2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบิน

(3.3) เจือจางเลือดกระต่ายแต่ละตัวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ ให้มีปริมาณฮีโมโกลบินอยู่ในช่วง (25.0 ± 2.5) มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นค่าฮีโมโกลบินปรากฏ (hemoglobin present)

(4) การทดสอบตัวอย่าง

(4.1) นำเลือดที่ได้จากข้อ 8.13.4.5(3.3) มาตัวละ 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายทดสอบ 4.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

(4.2) นำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับ ด้วยอัตราเร็ว 100 G ถึง 200 G เป็นเวลา 15 นาที

(4.3) ดูดส่วนใสด้านบนออก ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงใบใหม่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 700 G ถึง 800 G เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดแก้วใบใหม่ แล้วนำไปหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(5) การหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(5.1) นำส่วนใสจากข้อ 8.13.4.5(4.3) มา 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 3.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ 15 นาที

(5.2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินเป็นค่าฮีโมโกลบินปลดปล่อย (hemoglobin released)

(5.3) คำนวณค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือดจากสูตร

$$\text{ดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด} = \frac{\text{ฮีโมโกลบินปลดปล่อย}}{\text{ฮีโมโกลบินปรากฏ}} \times 100$$

(5.4) คำนวณค่าเฉลี่ยของดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด แล้วเทียบหาระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด

(ข้อ 8.13.4.5(5.4))

ดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด	ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด
0 ถึง น้อยกว่า 2	ไม่มีการแตกตัว
2 ถึง น้อยกว่า 10	มีการแตกตัวเล็กน้อย
10 ถึง น้อยกว่า 20	มีการแตกตัวปานกลาง
20 ถึง น้อยกว่า 40	มีการแตกตัวอย่างเห็นได้ชัด
40 ขึ้นไป	มีการแตกตัวอย่างรุนแรง

ภาคผนวก ก.

การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

(ข้อ 7.1)

ก.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ภาชนะพลาสติกชนิดเดียวกัน ที่ทำโดยกรรมวิธีเดียวกันและในคราวเดียวกัน หรือที่ทำหรือส่งมอบหรือซื้อขายในระยะเวลาเดียวกัน

ก.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ก.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป ความจุ ความสม่ำเสมอของความหนา ความหยุ่นตัว และเครื่องหมายและฉลาก

ก.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ก.1

ก.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 5.1 ตามตารางที่ 1 รายการที่ 1 รายการที่ 2 และรายการที่ 6 และตามข้อ 6. ในแต่ละรายการ ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ก.1 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป ความจุ ความสม่ำเสมอของความหนา ความหยุ่นตัว และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ก.2.1)

ขนาดรุ่น ใบ	ขนาดตัวอย่าง ใบ	เลขจำนวน ที่ยอมรับ
ไม่เกิน 1 200	20	2
1 201 ถึง 10 000	32	3
10 001 ขึ้นไป	50	5

ก.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบรูรั่ว ความทนทานต่อการตกกระแทก ความทนความดัน ปริมาณอนุภาคปนเปื้อน และความโปร่งแสง

ก.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 20 ใบ

ก.2.2.2 ตัวอย่างทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามตารางที่ 1 รายการที่ 3 รายการที่ 5 รายการที่ 9 และรายการที่ 10 และจำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามตารางที่ 1 รายการที่ 4 ต้องไม่เกิน 1 ตัวอย่าง จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบวัสดุ (เฉพาะพอลิไวนิลคลอไรด์) ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา คุณลักษณะด้านความปลอดภัย ปริมาณแคลเซียม ปริมาณโลหะหนัก ปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ และคุณลักษณะทางชีวภาพ

ก.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ก.2

ก.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.2 และตามตารางที่ 1 รายการที่ 8 รายการที่ 11 รายการที่ 12 รายการที่ 13 รายการที่ 14 และรายการที่ 15 ทุกรายการ จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.2 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบวัสดุ (เฉพาะพอลิไวนิลคลอไรด์) ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา คุณลักษณะด้านความปลอดภัย ปริมาณแคลเซียม ปริมาณโลหะหนัก ปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ และคุณลักษณะทางชีวภาพ

(ข้อ ก.2.3)

ขนาดรุ่น ใบ	ขนาดตัวอย่าง ใบ
ไม่เกิน 1 200	20
1 201 ถึง 10 000	32
10 001 ขึ้นไป	50

ก.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ

ก.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ก.3

ก.2.4.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามตารางที่ 1 รายการที่ 7 ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ก.3 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.3 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ

(ข้อ ก.2.4)

ขนาดรุ่น ใบ	ขนาดตัวอย่าง ใบ	เลขจำนวน ที่ยอมรับ
ไม่เกิน 1 200	20	1
1 201 ถึง 10 000	32	2
10 001 ขึ้นไป	50	3

ก.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างภาชนะพลาสติกต้องเป็นไปตามข้อ ก.2.1.2 ข้อ ก.2.2.2 ข้อ ก.2.3.2 และข้อ ก.2.4.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้